

Małgorzata Kalemba-Drożdż¹

Niedobory folianów w diecie i ich wpływ na stabilność genetyczną*

Abstract

Folates take part in many major biochemical processes in human cells including: replication, DNA repair, DNA methylation and detoxification processes. Folic acid deficiency in diet increases the risk of neural tube defect in fetus, cardiovascular disease in adults and furthermore the loss of genetic stability and, as the consequence, neoplastic diseases. The dietary deficiency of folic acid affects more than 90% of population in Malopolska Province.

Key words: folic acid, MTHFR, genetic stability, DNA damage, nutrition allowances

Zmiany w materiale genetycznym wynikające z niedoborów dietetycznych mogą przypominać uszkodzenia powodowane przez promieniowanie jonizujące: pojedynczo- i podwójnoniciowe pęknięcia DNA oraz modyfikacje oksydacyjne zasad azotowych. Stwierdzono, że niedobory niektórych składników, takich jak: witamina C, witamina A, witamina E, cynk i żelazo, prowadzą do zwiększenia ilości oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Podobnie niezrealizowanie dziennego zapotrzebowania na kwas foliowy prowadzi do zmniejszenia stabilności genetycznej przez wzrost poziomu błędnie wbudowanego uracylu, zmianę stopnia metylacji i pęknięcia chromosomów [1–6]. Poziom uszkodzeń DNA zależy zarówno od ich bezpośredniej indukcji, jak i od wydajności usuwania hydroksylowych metabolitów pośrednich, zwykle w procesach sprzęgania z niskocząsteczkowymi związkami, takimi jak glutation czy grupy metylowe. Niedobory tych ostatnich są związane z niewystarczającą ilością spożywanego kwasu foliowego i/lub z niską aktywnością enzymu, reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianu (MTHFR). Aktywność tego enzymu determinowana jest polimorfizmem kodującego go genu.

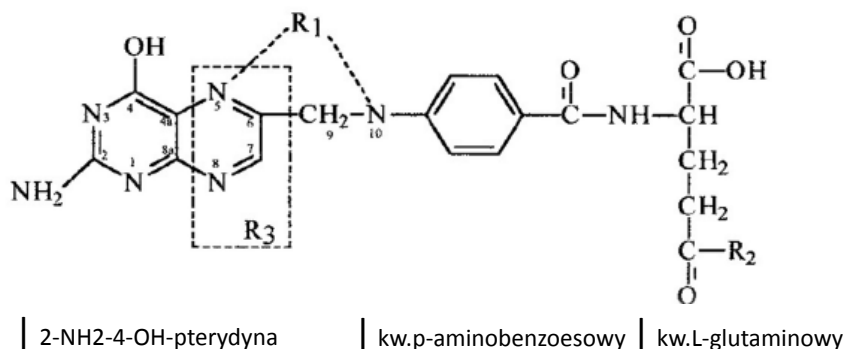
¹ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych.

* Podziękowania składam na ręce kierownik badań prof. dr hab. Marii Kapiszewskiej oraz doktora Tomasza Milewicza.

Pochodne kwasu foliowego – foliany, uczestniczą w wielu reakcjach biochemicznych w komórkach. Foliiany są głównym przenośnikiem grup jednowęglowych o różnym stopniu utlenienia, przez co mogą uczestniczyć w szeregu różnorodnych reakcji enzymatycznych. Są niezbędne wszystkim komórkom organizmu, jednak ich niedobory najszybciej ujawniają się w pogorszeniu kondycji nabłonków, w układzie krwiotwórczym w postaci niedokrwistości oraz w układzie nerwowym. Wchłanianie kwasu foliowego z układu pokarmowego jest silnie zaburzane przez alkohol, nikotynę, środki antykoncepcyjne i niektóre leki.

Podstawową postacią koenzymatyczną kwasu foliowego jest jego zredukowana forma – tetrahydrofolian (THF) (ryc. 1).

Rycina 1. Wzór chemiczny kwasu foliowego



Dzięki występowaniu na różnych stopniach utlenienia THF może przenosić grupy: metylowe, metylenowe, metenylowe, formylowe, formiminowe. Bierze więc udział w przemianach szeregu aminokwasów (seryny, glicyny, histydyny), resyntezie metioniny i biosyntezie zasad purynowych i pirymidynowych – prekursorów DNA i RNA.

Głównym źródłem pokarmowym kwasu foliowego są warzywa, przede wszystkim zielone, owoce, produkty pełnoziarniste, a także mięso i wątroba. W pewnym stopniu kwas foliowy jest również syntetyzowany przez endogenną florę jelitową. Pod wpływem enzymów jelitowych poliglutaminowe pochodne kwasu foliowego zostają rozszczepione do monoglutamylfolianów i w takiej postaci są absorbowane do układu krwionośnego. Kwas foliowy jest redukowany do dihydrofolianu (DHF), a następnie redukowany przez reduktazę dihydrofolianową (DHFR) do tetrahydrofolianu (THF). Rycina 2 przedstawia uproszczony schemat reakcji metabolicznych związanych ze stabilnością genetyczną, w których uczestniczą foliany.

Niedobory folianów mogą wpływać na stabilność genetyczną komórek ponieważ foliany biorą udział w produkcji *de novo* puryn oraz syntezie tymidyny. Do syntezy puryn niezbędne są 5,10-metylenoTHF oraz 10-formyloTHF. W wyniku utlenienia 5,10-metylenoTHF do 5,10-metenyloTHF, a następnie przekształcenia go, powstaje 10-formyloTHF, ten zaś może odwracalnie być izomeryzowany do 5-formyloTHF.

5,10-metylenoTHF służy jako donor grup metylowych do syntezy tymidyny z mononukleotydu urydynowego, za co odpowiada syntaza tymidylanowa. W trakcie reakcji metylacji monofosforanu deoksyurydyny do monofosforanu deoksytymidyny, tetrahydrofolian zostaje utleniony do dihydrofolianu (DHF), który następnie może być redukowany do THF w reakcji katalizowanej przez reduktazę dihydrofolianu (DHFR). Niedobory kwasu foliowego prowadzą do zmniejszenia się puli tyminy niezbędnej do polimeryzacji i naprawy DNA. W takim przypadku może dojść do błędnego wbudowywania uracylu w miejsce tyminy do DNA. Obecność uracylu w DNA jest także wynikiem spontanicznej deaminacji deoksycytozyny. Takie zaburzenie ma wysoki potencjał mutageny, ponieważ naprzeciwko uracylu wbudowywana jest preferencyjnie adenina, co

w trakcie replikacji może prowadzić do zmiany pary zasad GC na AT w potomnej cząsteczce DNA. W ludzkim materiale genetycznym codziennie pojawia się średnio kilkaset cząsteczek uracylu, zaś w przypadku niedoborów kwasu foliowego ta liczba wzrasta do 4 milionów.

Błędnie wbudowany nukleotyd urydylowy jest specyficznie wycinany przez glikozylazę uracylową (UDG). Luki w DNA są uzupełniane przez polimerazę DNA, a końce nici łączone przez ligazę. Jeżeli w trakcie procesów naprawczych nadal panuje deficyt folianów, a co za tym idzie nukleotydów tymidynowych, komórce grozi całkowita destabilizacja genetyczna ponieważ mogą wtedy powstać podwójnoniciowe pęknięcia DNA i aberracje chromosomowe.

Tak silne zaburzenia integralności genomu mogą prowadzić do kancerogenezy. Wykazano, iż limfocyty *in vitro* hodowane w pożywce pozbawionej kwasu foliowego charakteryzuje znacznie obniżona zdolność naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA indukowanych nadtlaniem wodoru w porównaniu do komórek hodowanymi w pożywce bogatej w foliany [7]. Natomiast nasze badania wskazują, że poziom błędnie wbudowanego uracylu do DNA limfocytów kobiet w wieku reprodukcyjnym ulega obniżeniu pod wpływem suplementacji diety 400 µg kwasu foliowego dziennie. Ponadto stwierdzono, że po 4-tygodniowej suplementacji diety o 400 µg kwasu foliowego dziennie, obniżeniu ulega również poziom uszkodzeń oksydacyjnych [5, 6]. Dane te potwierdzają doniesienia, że niedobory folianów w organizmie są związane ze wzrostem ryzyka nowotworów płuc, piersi, przełyku, mózgu i jelita grubego [1, 8].

Jednocześnie kwas foliowy odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu właściwego poziomu metylacji genomu, co również przekłada się na stabilność genetyczną komórki. 5,10-metylenoTHF (N^5,N^{10} -metylenotetrahydrofolian) ulega redukcji pod wpływem reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) do 5-metyloTHF (N^5 -metylotetrahydrofolian), którego stężenie mierzone jest w surowicy krwi. MTHFR jest enzymem limitującym cykl aktywnego metylu. 5-metyloTHF służy jako donor grupy metylowej w reakcji remetylacji homocysteiny do metioniny. Kofaktorem syntazy metioninowej jest witamina B12. Metionina natomiast jest prekursorem S-adenozylometioniny (SAM). SAM jest swoistym buforem grup metylowych. SAM uczestniczy w licznych reakcjach jako ich donor, między innymi w procesie metylacji DNA oraz inaktywacji związków aromatycznych w II fazie detoksyfikacji. Niewystarczające stężenie SAM prowadzi do hipometylacji DNA istotnej dla utrzymania homeostazy komórkowej [9–11]. Po przeniesieniu grupy metylowej z SAM na substrat powstaje S-adenozylhomocysteina (SAH), która następnie ulega hydrolizie do adenozyiny i homocysteiny. Niedostateczna podaż folianów oraz witaminy B12 skutkuje obniżeniem stężenia S-adenozylometioniny.

Homocysteina może stanowić pośredni substrat do syntezy cysteiny przez syntazę cystationiny zależną od witaminy B6, gdzie donorem grupy metylowej jest betaina [12]. Odpowiednia ilość 5-metyloTHF zapobiega nagromadzeniu

homocysteiny i odnawianiu puli metioniny. Odkładanie się homocysteiny jest czynnikiem patogennym (homocysteinemia) w chorobach związanym z układem krążenia i niedorozwojem umysłowym [12].

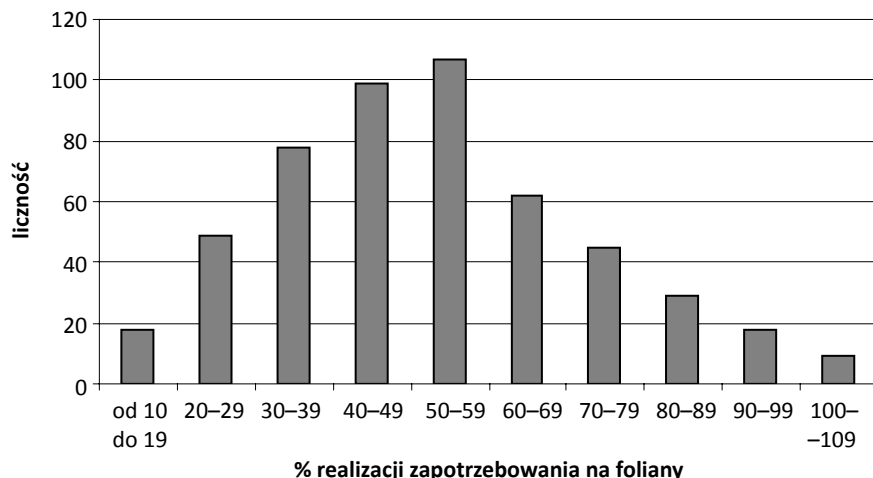
Do hipometylacji genomowej może dojść w efekcie niedoboru kwasu foliowego, a także w wyniku deficytu witaminy B12. Metylacja specyficznych cytozyn w sekwencji DNA odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów. Około 4% cytozyn w DNA komórek ssaków jest w formie zmetylowanej. Występują one najczęściej w sekwencjach palindromowych oraz w dwójkach nukleotydowych C^mG. Zmiany poziomu metylacji w obrębie regionów promotorowych stanowią ważny czynnik kontroli transkrypcji genów mogące prowadzić do supresji transkrypcji. Hipometylacja może potencjalnie indukować protoonkogeny prowadząc do promocji procesów nowotworowych. Natomiast hipermetylacja regionów promotorowych genów supresorowych może prowadzić do ich inaktywacji powodując destabilizację procesów komórkowych.

Badanie poziomu metylacji DNA oraz wzorca metylacji wybranych genów stanowią dobry sposób oceny inicjacji kancerogenezy. Badania nad nowotworami piersi, prostaty, macicy, okrężnicy i tarczycy sugerują, że pojawienie się mutacji jest konsekwencją wcześniejszej hipometylacji [1, 2, 7, 13–15]. U osób poddanych długoterminowej diecie ubogiej w kwas foliowy wykazano występowanie hipometylacji w DNA limfocytów izolowanych z krwi obwodowej. Po przywróceniu prawidłowo zbilansowanej diety o odpowiedniej ilości folianów, metylacja wracała do poziomu wyjściowego [1, 2].

Kwas foliowy jest czynnikiem niezwykle istotnym w czasie ciąży. Jego niedobory ograniczają wzrost i tempo podziałów komórkowych, co może prowadzić do poważnego niedorozwoju płodu, schorzeń mięśnia sercowego, zaburzenia rozwoju układu nerwowego. Najlepiej poznanym objawem chorobowym, jaki niedobory folianów mogą wywierać na rozwój płodu, jest rozszczepienie cewy nerwowej u niemowląt [16]. Deficyt folianów wpływa również na przedwczesny poród oraz niską wagę urodzeniową niemowląt, co jest prawdopodobnie spowodowane niedorozwojem łożyska [17]. W czasie ciąży foliany z krwiobiegu matki są wychwytywane przez receptory folianowe komórek kosmówki, a następnie zgodnie z malejącym gradientem stężeń, są przekazywane do krążenia płodu.

Zakłada się, że zalecane dzienne spożycie kwasu foliowego wynosi 270 µg, przy czym zapotrzebowanie na foliany rośnie u osób starszych, spożywających nawet nieznaczne ilości alkoholu, nadużywających kąpeli słonecznych oraz kobiet przyjmujących środki antykoncepcyjne. Natomiast dla kobiet ciężarnych wartość zapotrzebowania dietetycznego na foliany kształtuje się na poziomie 400 µg dziennie. Za deficyt folianów uznaje się stan, gdy ich stężenie w erytrocytach jest niższe niż 140 ng/ml, oraz mniejsze niż 6 ng/ml w surowicy [18].

Rycina 3. Spożycie kwasu foliowego w diecie kobiet z Małopolski
n = 512 (bez suplementacji)



Stosując metodę analizy kwestionariuszy żywieniowych, stwierdzono, że u 90% kobiet zarówno w ciąży, jak i kobiet nieciążarnych z województwa małopolskiego występują niedobory kwasu foliowego w diecie, zaś u ponad połowy ankietowanych, realizacja zapotrzebowania na kwas foliowy nie osiągnęła nawet połowy rekomendowanego poziomu (ryc. 3). Zalecana suplementacja 400 µg kwasu foliowego dziennie przez 4 tygodnie u kobiet w wieku rozrodczym oraz przez cały okres ciąży u kobiet ciężarnych spowodowała, że w surowicy stężenie folianów nie spadło poniżej 13 ng/ml.

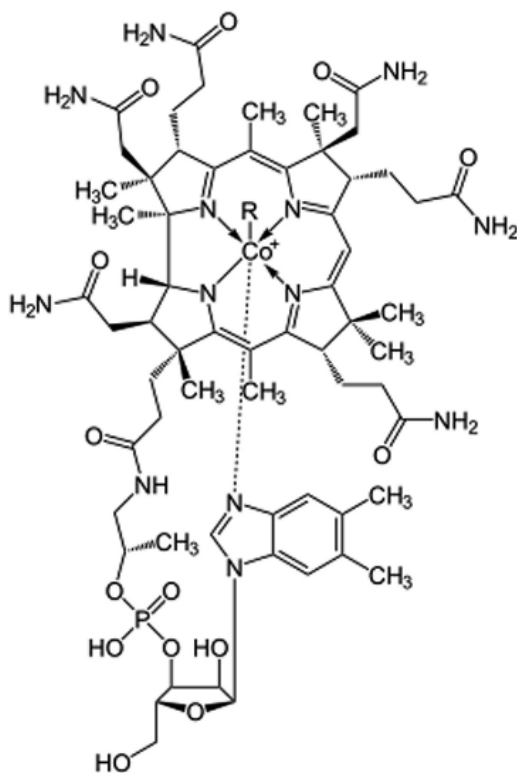
Pomimo że niniejsze badanie koncentrowało się wyłącznie na kobietach, na podstawie danych socjologicznych można wnioskować, iż kwestia niedoborów dietetycznych kwasu foliowego dotyczy w takim samym lub nawet większym stopniu również mężczyzn [34].

Głównym folianem, którego stężenie oznacza się w surowicy jest 5-metyloTHF [19]. Ustalono, że aby utrzymać stabilność genetyczną komórek rozumianą jako: zapobieganie hipometylacji, zapobiegania błędnemu wbudowywaniu uracylu do DNA, wprowadzaniu pęknięć pojedynczo- i podwójnoniciowych DNA oraz aberracji chromosomowych, wymagane jest średnie stężenie folianów w surowicy powyżej 21 ng/ml, oraz powyżej 464 ng/ml w erytrocytach [4, 20]. Według niektórych badań optymalny poziom kwasu foliowego w surowicy warunkujący utrzymanie stabilności genetycznej powinien przekraczać 13 ng/ml lub 313 ng/ml folianów w krwinkach czerwonych [2, 18]. Erytrocyty stanowią główny rezerwuár kwasu foliowego. Krótkotrwałe niedobory folianów w diecie nie są w stanie zakłócić metabolizmu tego związku, dopiero długotrwały deficyt może naruszyć magazynowane rezerwy [21]. Dane epidemiolo-

giczne pochodzące z Irlandii i USA, dowodzą, że deficyt kwasu foliowego jest najczęściej występującym niedoborem spośród wszystkich witamin [21–27]. Należy wspomnieć, że dietę ubogą w foliany często też charakteryzuje deficyt witamin przeciwutleniających. Stąd w konsekwencji obniżony status antyoksydacyjny z jednoczesnym niedoborem kwasu foliowego stanowi czynnik ryzyka w promowaniu niestabilności genetycznej [3, 18, 20, 28–30]. Potwierdzono, że dieta suplementowana kwasem foliowym przez 4 tygodnie, sprzyja redukcji ilości endogennych uszkodzeń oksydacyjnych DNA w limfocytach izolowanych z krwi obwodowej kobiet w wieku rozrodczym [5].

Wysokie spożycie kwasu foliowego nie jest jednak jedynym warunkiem stabilności genetycznej. Niedobory witaminy B12 – kofaktora syntazy metioninowej, prowadzić mogą do tzw.: pułapki folianowej, czyli gromadzenia się 5-metyloTHF wobec niemożności wykorzystania go w reakcji metylacji homocysteiny do metioniny. Brak regeneracji 5-metyloTHF do tetrahydrofolianu prowadzi do obniżenia poziomu 5,10-metylenoTHF, stanowiącego donor grupy metylowej dla syntazy tymidylanowej i wzrostu poziomu błędnie wbudowanego uracylu do DNA [3, 4, 6, 12, 28].

Rycina 4. Wzór chemiczny witaminy B12



Zazwyczaj deficytem witaminy B12 określa się stan, gdy jej stężenie w surowicy jest niższe niż 150 pg/ml. Źródłem pokarmowym kobalaminy jest wyłącznie pokarm pochodzenia zwierzęcego, szczególnie mięso i wątroba. Niedobory w związku z tym dotyczą przede wszystkim wegan oraz osób z niedoborem czynnika Castle'a, niezbędnego do wchłaniania tej witaminy, co często występuje u osób starszych.

Witamina B12 w organizmie ludzkim jest kofaktorem tylko dwóch enzymów: syntazy metionowej i mutazy metylomalonylo-CoA, która katalizuje zależną od adenozylokobalaminy izomeryzację L-metylomalonoylo-CoA do bursztynylo-CoA. Koenzym B12 stanowi źródło wolnych rodników niezbędnych do przebiegu tych reakcji, polegających na zmianie dwóch grup pomiędzy atomami węgla substratów.

Badania z zastosowaniem metody mikrojąder wykazują, że poziom witaminy B12 we krwi zapobiegający niestabilności genetycznej powinien przekraczać 200 pg/ml [2, 31]. Zastosowanie znacznie czulszej metody kometowej do badania uszkodzeń DNA w limfocytach pokazało jednak, że stężenie witaminy B12 nie powinno być niższe niż 400 pg/ml [6].

Deficyt kwasu foliowego w pożywieniu ma szczególne znaczenie dla ilości błędnie wbudowanego uracylu do DNA u osób, u których aktywność reduktazy metylenotetrahydrofolianu (MTHFR) (EC 1.5.1.20) kodowanej przez polimorficzny gen MTHFR jest niska. Gen MTHFR znajduje się na chromosomie 1p36.3 i składa się z 11 eksonów. Występują w nim dwa dobrze opisane miejsca zmienności pojedynczych nukleotydów. W obrębie eksonu 4 kodującego domenę katalityczną MTHFR występuje tranzycja cytozyny na tyminę w pozycji 677 w 222 kodonie, powodując zastąpienie alaniny waliną w białku. Zmiana ta skutkuje powstaniem enzymu o niższej aktywności katalitycznej oraz o niższej stabilności cieplnej w warunkach *in vitro* [32].

Polimorfizm ten determinuje wystąpienie trzech grup fenotypowych. Heterozygotyczność MTHFR w pozycji 677 CT powoduje, że mierzona aktywność reduktazy metylenotetrahydrofolianu spada do 60% w stosunku do homozygoty dzikiego typu CC, natomiast homozygoty TT wykazują aktywność zredukowaną do około 30%. Choć polimorfizmy występujące w pozycjach 677 i 1298 MTHFR (ekson 4 i 7) mogą mieć przeciwny wpływ fenotypowy na stężenie kwasu foliowego we krwi, to obydwa są związane z redukcją ryzyka kancerogenezy [33].

Niska konwersja 5,10-metylenoTHF w 5-metyloTHF zabezpiecza pulę substratu dla syntazy tymidylanowej, natomiast przesunięcie równowagi w kierunku 5-metyloTHF zwiększa jego pulę niezbędną do procesów naprawczych i detoksyfikacyjnych, którym sprzyja wysoka podaż grup metylowych. Wysokie stężenie metioniny i SAM – inhibitorów enzymu MTHFR oraz niski poziom kofaktora dinukleotydu flawinowo-adeninowego (FAD), spowodowanego np. niedoborami ryboflawiny (witaminy B2), będącej prekursorem FAD, zmniejszają aktywność MTHFR.

Ze względu na istotną rolę folianów w utrzymaniu stabilności genetycznej komórek oraz fakt, że jego niedobory dotyczą ponad 90% populacji Małopolski, będącej dobrym reprezentantem całego kraju, wskazane jest podjęcie działań edukacyjnych w społeczeństwie w celu zwiększenia świadomości zdrowotnej i promocji prawidłowej, bogatej w kwas foliowy diety. Obowiązkowa suplementacja kwasem foliowym diety kobiet ciężarnych wydaje się, przy obecnym stanie rzeczy, słusznym zaleceniem. Natomiast ze względu na niezmiennie ważne funkcje kwasu foliowego pełnione w naszym organizmie niezależnie od wieku i płci, przede wszystkim istnieje konieczność kształtowania właściwych nawyków i wyborów żywieniowych w całym naszym społeczeństwie, a zwłaszcza wśród osób młodych.

Bibliografia

- [1] Duthie S.J. et al., *Impact of Folate Deficiency on DNA Stability*, „Journal of Nutrition” 2002, Vol. 132 (8 Suppl), s. 2444S–2449S.
- [2] Fenech M., *The Role of Folic Acid and Vitamin B12 in Genomic Stability of Human Cells*, „Mutation Research” 2001, Vol. 475, No. 1–2, s. 57–67.
- [3] Fenech M., *Micronutrients and Genomic Stability: A New Paradigm for Recommended Dietary Allowances (RDAs)*, „Food and Chemical Toxicology” 2002, Vol. 40, No. 8, s. 1113–1117.
- [4] Kalembe M. et al., *The Increased Amount of Vitamin B12 in Serum is Needed to Minimize the Uracil Misincorporation Into DNA During Folate Supplementation*, „Trends in Food Science & Technology” 2005, Vol. 16, No. 6–7, s. 317–320.
- [5] Kalembe M.A., Kapiszewska M., *The Influence of Fruit, Vegetable and Folate Intake on Level of Endogenous Oxidative DNA Damage in Leukocytes of Subjects with Different Polymorphism of COMT Gene*, [in:] *XII International Conference on Polyphenols*, Helsinki 2004.
- [6] Kapiszewska M. et al., *Uracil Misincorporation Into DNA of Leukocytes of Young Women with Positive Folate Balance Depends on Plasma Vitamin B12 Concentrations and Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms. A Pilot Study*, „The Journal of Nutritional Biochemistry” 2005, Vol. 16, No. 8, s. 467–478.
- [7] Duthie S.J. et al., *Folate Deficiency in Vitro Induces Uracil Misincorporation and DNA Hypomethylation and Inhibits DNA Excision Repair in Immortalized Normal Human Colon Epithelial Cells*, „Nutrition and Cancer” 2000, Vol. 37, No. 2, s. 245–251.
- [8] Fenech M., *Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer*, „Drug Discovery Today” 2002, Vol. 7, Issue 22, s. 1128–1137.
- [9] Larsson S.C., Giovannucci E., Wolk A., *Vitamin B6 Intake, Alcohol Consumption, and Colorectal Cancer: A Longitudinal Population-based Cohort of Women*, „Gastroenterology” 2005, Vol. 128, No. 7, s. 1830–1837.

- [10] Otani T. et al., *Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, and Vitamin B2 Intake, Genetic Polymorphisms of Related Enzymes, and Risk of Colorectal Cancer in a Hospital-based Case-control Study in Japan*, „Nutrition and Cancer” 2005, Vol. 53, No. 1, s. 42–50.
- [11] Wei E.K. et al., *Plasma Vitamin B6 and the Risk of Colorectal Cancer and Adenoma in Women*, „Journal of the National Cancer Institute” 2005, Vol. 97, No. 9, s. 684–692.
- [12] Wierzbicki A.S., *Homocysteine and Cardiovascular Disease: A Review of the Evidence*, „Diabetes and Vascular Disease Research” 2007, Vol. 4, No. 2, s. 143–150.
- [13] Duthie S.J., *Folic Acid Deficiency and Cancer: Mechanisms of DNA Instability*, „British Medical Bulletin” 1999, Vol. 55, No. 3, s. 578–592.
- [14] Habib E.E., Aziz M., Kotb M., *Genetic Polymorphism of Folate and Methionine Metabolizing Enzymes and Their Susceptibility to Malignant Lymphoma*, „Journal of the Egyptian National Cancer Institute” 2005, Vol. 17, No. 3, s. 184–192.
- [15] Wang X. et al., *Folate Deficiency Induces Aneuploidy in Human Lymphocytes in Vitro-evidence Using Cytokinesis-blocked Cells and Probes Specific for Chromosomes 17 and 21*, „Mutation Research” 2004, Vol. 551, No. 1–2, s. 167–180.
- [16] Molloy A.M., *Folate and Homocysteine Interrelationships Including Genetics of the Relevant Enzymes*, „Current Opinion in Lipidology” 2004, Vol. 15, No. 1, s. 49–57.
- [17] Molloy A.M., *Folate Bioavailability and Health*, „International Journal for Vitamin and Nutrition Research” 2002, Vol. 72, No. 1, s. 46–52.
- [18] Fenech M., Ferguson L.R., *Vitamins/Minerals and Genomic Stability in Humans*, „Mutation Research” 2001, Vol. 475, No. 1–2, s. 1–6.
- [19] Hart D.J. et al., *Determination of 5-methyltetrahydrofolate (13C-labeled and Unlabeled) in Human Plasma and Urine by Combined Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, „Analytical Biochemistry” 2002, Vol. 305, No. 2, s. 206–213.
- [20] Fenech M., *Recommended Dietary Allowances (RDAs) for Genomic Stability*, „Mutation Research” 2001, Vol. 480–481, s. 51–54.
- [21] Bruinse H.W., van den Berg H., *Changes of Some Vitamin Levels During and After Normal Pregnancy*, „European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology” 1995, Vol. 61, No. 1, s. 31–37.
- [22] Walsh T. et al., *Maternal Folate Status and Neural Tube Defects in Ireland: The Need for a National Food Fortification Program*, „The Irish Medical Journal” 2007, Vol. 100, No. 5, s. 469–472.
- [23] Ueland P.M., Clarke R., *Homocysteine and Cardiovascular Risk: Considering the Evidence in the Context of Study Design, Folate Fortification, and Statistical Power*, „Clinical Chemistry” 2007, Vol. 53, No. 5, s. 807–809.
- [24] Morris M.S. et al., *Folate and Vitamin B-12 Status in Relation to Anemia, Macrocytosis, and Cognitive Impairment in Older Americans in the Age of Folic Acid Fortification*, „The American Journal of Clinical Nutrition” 2007, Vol. 85, No. 1, s. 193–200.

- [25] Martinez M.E. et al., *Folate Fortification, Plasma Folate, Homocysteine and Colorectal Adenoma Recurrence*, „International Journal of Cancer” 2006, Vol. 119, No. 6, s. 1440–1446.
- [26] Bower C. et al., *Plenty of Evidence on Mandatory Folate Fortification*, „Australian and New Zealand Journal of Public Health” 2006, Vol. 30, No. 1, s. 81–82; author reply 82–83.
- [27] Lawrence J.M. et al., *Trends in Serum Folate After Food Fortification*, „Lancet” 1999, Vol. 354, No. 9182, s. 915–916.
- [28] Ames B.N., *DNA Damage from Micronutrient Deficiencies is Likely to be a Major Cause of Cancer*, „Mutation Research” 2001, Vol. 475, No. 1–2, s. 7–20.
- [29] Duthie S.J., Hawdon A., *DNA Instability (Strand Breakage, Uracil Misincorporation, and Defective Repair) is Increased by Folic Acid Depletion in Human Lymphocytes in Vitro*, „The FASEB Journal” 1998, Vol. 12 (14), s. 1491–1497.
- [30] Fenech M., *Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology*, „Toxicology” 2002, Vol. 181–182, s. 411–416.
- [31] Finglas P.M. et al., *Is there More to Folates than Neural-tube Defects?*, „Proceedings of the Nutrition Society” 2003, Vol. 62, No. 3, s. 591–598.
- [32] Abu-Amero K.K., Wyngaard C.A., Dzimiri N., *Prevalence and Role of Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C→T and 1298 A→C Polymorphisms in Coronary Artery Disease in Arabs*, „Archives of Pathology & Laboratory Medicine” 2003, Vol. 127, No. 10, s. 1349–1352.
- [33] Parle-McDermott A. et al., *The MTHFR 1298CC and 677TT Genotypes have Opposite Associations with Red Cell Folate Levels*, „Molecular Genetics and Metabolism” 2006, Vol. 88, No. 3, s. 290–294.
- [34] Ostrowska A., *Kobiety i mężczyźni. Jak styl i warunki życia różnicują zdrowie*, „Rocznik Lubuski” 2006, t. 32, cz. 2.